

## POSTES DE SÉCURITÉ MICROBIOLOGIQUE UTILISABLES EN ASSISTANCE MÉDICALE A LA PROCREATION

L'invention concerne le domaine des postes de sécurité microbiologique (ci-après désignés par l'acronyme PSM), permettant la manipulation  
5 d'échantillons microscopiques sous contrôle visuel. L'invention porte plus particulièrement sur des PSM adaptés à la manipulation de matériel biologique, et en particulier à la fécondation *in vitro* (FIV), sans être toutefois limités à ce domaine d'application.

Les manipulations de matériel biologique nécessitent le plus souvent des  
10 moyens de protection des échantillons manipulés et/ou du manipulateur vis-à-vis des risques microbiologiques. Ces manipulations sont donc, en général, effectuées dans des hottes à flux laminaire de type horizontal ou vertical.

Les hottes à flux laminaire horizontal sont des enceintes où l'air provient de la partie postérieure de la hotte et se dirige horizontalement vers la partie  
15 antérieure de celle-ci, qui est largement, voire entièrement ouverte. Le manipulateur est placé devant cette partie ouverte, et se trouve par conséquent exposé aux projections provenant du prélèvement qu'il est en train de manipuler et/ou traiter. Dans cette configuration, le manipulateur n'est donc pas protégé des contaminations éventuelles.

20 La protection du manipulateur est assurée dans les postes de sécurité microbiologique (PSM), dont le modèle le plus simple (PSM de type I) présente un flux d'air entrant dans la hotte et un système de filtration de l'air expulsé. En revanche, les échantillons manipulés dans les PSM de type I ne sont pas protégés.

Dans les hottes à flux laminaire vertical, le flux provient du plafond de la hotte et descend vers le plan de travail. Sur la partie antérieure de ces hottes existe une vitre protectrice pour éviter les projections hors de celle-ci. Ces hottes constituent donc des postes de sécurité microbiologique, puisqu'elles protègent le manipulateur. Les hottes à flux laminaire vertical appartiennent à la catégorie des PSM de type II, définis en ce qu'ils assurent la protection du prélèvement, du manipulateur et aussi de l'environnement, lorsqu'ils sont équipés d'un système de filtration de l'air expulsé.

Certains types de manipulations microbiologiques nécessitent une observation agrandie de l'échantillon manipulé, et donc l'utilisation d'une loupe binoculaire ou d'un microscope. L'introduction d'un tel dispositif optique dans une hotte à flux laminaire perturbe le flux, et donc diminue l'efficacité de la hotte. L'utilisation d'une loupe binoculaire ou d'un microscope sous une hotte à flux vertical est particulièrement difficile (voire impossible), du fait de la vitre protectrice située sur la face avant de la hotte. De plus, l'introduction de matériel dans l'espace de travail d'une hotte nuit à la facilité de nettoyage dudit espace de travail et contribue à augmenter les risques de contamination entre différents échantillons manipulés.

Les PSM et hottes à flux laminaire horizontal actuellement disponibles ne permettent donc pas de manipuler des échantillons biologiques sous contrôle visuel à travers un dispositif optique grossissant, dans des conditions assurant la sécurité microbiologique de l'échantillon et du manipulateur et permettant en outre un nettoyage facile de l'espace de manipulation.

La présente invention a pour but de résoudre une partie au moins des inconvénients précités .

La présente invention porte sur un poste de sécurité microbiologique (PSM), comportant des parois définissant un espace de travail, et dans lequel on prévoit un dispositif optique placé en-dehors de l'espace de travail, et permettant l'observation d'un échantillon dans au moins une zone de l'espace de travail par une fenêtre transparente solidaire de l'une desdites parois.

Dans une réalisation particulière de l'invention, le PSM comprend une platine P propre à recevoir l'échantillon dans la zone d'observation de l'espace de travail, la platine comportant une fenêtre transparente F1 permettant l'éclairage et/ou l'observation de l'échantillon.

En outre, le plancher de l'espace de travail d'un PSM selon l'invention peut comporter une ou plusieurs zones équipées de moyens de régulation de température de manière à être thermostatées à une température comprise entre 20 et 45 °C, et en particulier à 37°C +/- 0,2°C. En particulier, la platine P mentionnée ci-dessus peut être équipée d'un tel dispositif de régulation de température.

Dans les PSM de l'invention, le dispositif optique d'observation comprend, de préférence, des moyens d'éclairage propres à éclairer l'échantillon dans la zone d'observation, et des moyens de collection de lumière permettant l'observation d'un échantillon dans cette zone d'observation. Tous ces moyens peuvent être situés sous le plancher de l'espace de travail, de façon à éclairer et observer l'échantillon par en-dessous, à travers la fenêtre F1 de la platine. Alternativement, tout ou partie des moyens d'éclairage et/ou de collection de lumière peuvent être situés derrière une ou plusieurs autres fenêtres prévues dans au moins l'une des parois, par exemple dans la paroi supérieure (plafond), placées en regard du plancher.

Le dispositif de collection de lumière du PSM de l'invention comporte, de préférence, une caméra autofocus. Afin d'observer des échantillons microscopiques, cette caméra est préférentiellement agencée pour assurer plusieurs grossissements de l'image entre 10 et 1000, en particulier entre 10 et 400, et le cas échéant, seulement entre 10 et 70.

Dans une réalisation préférée du PSM de l'invention, le dispositif optique de collection de lumière (par exemple, la caméra autofocus) comporte en outre des moyens de mise au point fine à chaque grossissement, qui peuvent être avantageusement pilotés à partir d'un tableau de bord situé en-dehors de l'espace de travail et/ou solidaire de l'une des parois définissant l'espace de travail. Par exemple, ce tableau de bord peut être situé sur la face avant, à l'extérieur de la hotte, ou sous forme de boutons ou de touches à commande tactile formées sur un écran, incorporés au plancher de la hotte, par exemple à gauche du poste de travail et d'observation.

Le dispositif de collection de lumière du PSM de l'invention est, de préférence, relié à un dispositif d'enregistrement des images collectées, comme par exemple un ordinateur équipé de moyens de stockage de données, tel qu'un disque dur ou un support d'enregistrement amovible.

Dans une réalisation préférée, le PSM de l'invention peut comporter un écran d'observation, solidaire de l'une des parois définissant l'espace de travail, ledit écran permettant à l'opérateur de visualiser les images collectées par le dispositif de collection de lumière. Cet écran d'observation peut être, par exemple, un écran plat intégré à la paroi postérieure de l'espace de travail.

Dans une réalisation particulière de l'invention, le PSM peut comporter, en outre, une zone de gazage des échantillons, comportant une arrivée de gaz, une enceinte permettant le confinement du gaz, et un dispositif de connexion

reliant l'arrivée de gaz à l'enceinte. De manière préférée, l'enceinte et le dispositif de connexion sont facilement démontables, et de manière encore préférée, l'enceinte et le dispositif de connexion sont des pièces rapportées de type consommables. Dans cette réalisation de l'invention, l'arrivée de gaz est préférentiellement intégrée à l'une des parois verticales définissant l'espace de travail, et l'enceinte est une cloche transparente, reliée à l'arrivée de gaz par un tuyau. Le dispositif de connexion reliant l'arrivée de gaz à l'enceinte peut avantageusement comporter une collerette protectrice destinée à protéger l'arrivée de gaz des projections.

Selon un autre mode de réalisation, le PSM de l'invention comprend un dispositif de saisie de données. Ce dispositif de saisie peut consister en un clavier tactile solidaire du plancher de la hotte et relié à un ordinateur. Alternativement, le clavier tactile peut être situé en-dehors de l'espace de travail, sur la face avant de la hotte. Le cas échéant, une feuille de données en cours de saisie peut être visualisée sur l'écran E mentionné ci-dessus, ou sur une portion de cet écran. Alternativement, un deuxième écran spécifique peut être intégré à une paroi de l'espace de travail.

Le plancher et les parois verticales définissant l'espace de travail d'un PSM selon l'invention sont préférentiellement planes et constituées de matériaux lisses, lavables et résistant aux produits d'entretien utilisés dans les laboratoires, tels que les produits contenant des ammoniums quaternaires ou les virucides les plus puissants. Alternativement et/ou de manière complémentaire, le plancher est constitué d'un ou plusieurs éléments démontables jetables ou stérilisables par autoclave.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à l'examen de la description détaillée ci-après, et des dessins annexés, sur lesquels :

- la figure 1 est une vue en perspective très schématique d'un poste de sécurité microbiologique (PSM) selon l'invention,

- la figure 2 détaille de façon schématique une partie du dispositif optique du PSM de la figure 1, et
- la Figure 3 représente un exemple de réalisation de clavier de saisie des données.

5 L'objet de la présente invention est un PSM (tel que défini dans l'introduction) comprenant plusieurs éléments coopérant de façon originale pour permettre une manipulation aisée et sous contrôle visuel, d'objets microscopiques, dans des conditions assurant la protection des objets manipulés et du manipulateur vis-à-vis des risques microbiologiques. Cette invention peut  
10 être utilisée pour tous les types d'applications nécessitant la protection microbiologique des objets manipulés et/ou du manipulateur. A titre d'exemples, on peut citer la confection de petit matériel stérile, la recherche en biologie ou en thérapie cellulaire (par exemple, pour la préparation de cornées destinées à être greffées), et la manipulation d'embryons ou de  
15 cellules souches. Un domaine d'application privilégié de cette invention est la fécondation *in vitro*.

Les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) ont pour enjeu la conception d'êtres humains. Elles sont aussi appliquées dans le domaine vétérinaire.

20 La Fécondation *In Vitro* (FIV) a pour but d'assurer la rencontre entre l'ovocyte (gamète féminin) et le spermatozoïde (gamète masculin) en dehors de l'organisme (*in vitro*).

Les différentes étapes biologiques de la FIV sont réparties sur plusieurs jours (Ji) :

- à J0
  - préparation des spermatozoïdes
  - recherche des ovocytes dans les liquides folliculaires contenus dans des seringues
  - mise en culture des ovocytes
  - insémination : mise en contact dans les boîtes de culture des spermatozoïdes avec les ovocytes.
- à J1
  - les ovocytes sont débarrassés, un à un, de leurs cellules environnantes (décoronisation), pour permettre l'examen microscopique des signes de fécondation (présence des Pronoyaux).
- à J2 ou J3
  - observation des premiers stades du développement embryonnaire
  - remplacement d'une partie des embryons dans la cavité utérine de la patiente à l'aide d'un petit cathéter.

Une grande rigueur doit accompagner ces opérations, notamment dans le domaine de la sécurité sanitaire. Les manipulateurs doivent en effet éviter la contamination des gamètes qui leur sont confiés, assurer une culture embryonnaire stérile sur le plan infectieux, et éviter les contaminations croisées entre prélèvements.

5

Pour atteindre ces objectifs, les différentes étapes des procédures de fécondation *in vitro* se font de façon stérile, classiquement sous une hotte à flux laminaire. Le flux laminaire des hottes a pour but d'empêcher l'introduction d'éléments étrangers potentiellement contaminants dans la zone de travail. Pour une efficacité optimum, la zone de manipulation doit être dépourvue d'objets perturbant le flux.

10

Cependant, la recherche des ovocytes (de diamètre de 150  $\mu\text{m}$ ), l'insémination, la décoronisation et le chargement du cathéter de transfert ne peuvent s'effectuer que sous contrôle de la vue, effectué actuellement par le biais d'une loupe binoculaire.

- 5 En conséquence, pour toutes les étapes de la FIV, sauf pour la préparation des spermatozoïdes, qui ne nécessite pas de contrôle microscopique, les praticiens ont besoin de placer une loupe binoculaire sous une hotte, afin de travailler dans des conditions d'asepsie correcte. Malheureusement, comme cela a été expliqué plus haut, l'utilisation d'une loupe binoculaire est incompatible avec l'utilisation d'une hotte à flux laminaire vertical. En
- 10 pratique, les étapes nécessitant un contrôle visuel microscopique sont effectuées en plaçant une loupe binoculaire sous une hotte à flux horizontal, ce qui pose trois types de problèmes : premièrement, le manipulateur n'est pas protégé ; deuxièmement, le flux est perturbé, ce qui diminue l'efficacité
- 15 de la hotte et donc le degré de protection de l'échantillon ; troisièmement, le nettoyage de la hotte (et de la loupe binoculaire) après manipulation d'un échantillon est long et difficile.

Dans le cadre de la FIV, le manipulateur a besoin d'être protégé pour, au moins, trois raisons :

- 20
- Tout prélèvement d'origine humaine doit être considéré *a priori* comme à risque infectieux ;
  - Il existe des gestes à risques de contamination, comme la projection possible de liquides biologiques lors de l'examen des liquides folliculaires, liquides qui sont assez souvent sanglants ;



- Enfin, certaines législations tendent à écarter les patients atteints de certaines maladies des protocoles d'assistance médicale à la procréation. Par exemple, en France, la loi de Bioéthique du 24 juillet 1994 oblige les praticiens à contrôler les sérologies HIV, hépatites B et C et syphilis de tous les patients devant bénéficier d'une AMP. Les patients infectés ne sont plus pris en charge.

La pression des couples dont l'une au moins des personnes est infectée par un des virus visés ci-dessus (hépatite B, hépatite C, VIH, syphilis) est devenue telle que des protocoles de recherche de prise en charge des patients ou des patientes infectés se sont mis en place. Dans certains hôpitaux, comme par exemple à l'Hôpital Cochin (Paris, France), des couples sérodifférents pour le virus du sida sont pris en charge, dans le cadre d'un protocole financé par l'ANRS (Association Nationale de Recherche contre le Sida). Cette prise en charge concerne les couples où le patient est séropositif et la patiente séronégative. Les couples où la patiente est séropositive ne sont pas pris en charge à cause du risque de contamination des manipulateurs lié au fait que lesdits manipulateurs travaillent sous hotte à flux laminaire horizontal pour les étapes de manipulation des gamètes féminins. En outre, certains laboratoires d'AMP ne prennent pas en charge les couples infectés par le virus de l'hépatite C, pour les mêmes raisons.

Pour pouvoir répondre à ces demandes et pour la protection du manipulateur, il est donc indispensable de travailler, pour toutes les étapes des AMP, dans des postes de sécurité microbiologique (PSM), par exemple sous des hottes à flux laminaire vertical.

Par ailleurs, la prise en charge de patients séropositifs pour un virus dangereux implique que l'espace de travail dans lequel les échantillons sont manipulés, soit systématiquement et parfaitement stérilisé après le traitement de chaque échantillon. En effet, il faut absolument éviter les contaminations

nosocomiales entre les patientes prises en charge dans les protocoles d'AMP. De telles contaminations ont été décrites (Lesourd *et al.*, Human Reproduction, 2000, Vol.15 n° 5, pp 1083-1085), soulignant l'attention qu'il convient de porter à ce problème.

5 Ce type de contamination nosocomiale peut provenir principalement de deux origines :

- En premier lieu, une contamination inter-échantillons peut provenir du manipulateur (suite à une projection d'un échantillon contaminé sur sa blouse, par exemple), ou d'objets utilisés par le manipulateur, tels que  
10 crayons ou cahier d'observations.

- La deuxième cause possible d'une contamination inter-échantillons est un nettoyage imparfait de la hotte et de son contenu. Le risque de contamination par la hotte et les instruments utilisés sous la hotte est d'autant plus élevé que l'espace de travail est encombré par de nombreux  
15 objets, et que ces objets sont d'une géométrie complexe. Ainsi, une loupe binoculaire, comportant notamment un plateau, plusieurs objectifs, des lampes et des molettes de réglage, est un instrument particulièrement long et difficile à nettoyer de façon à assurer sa stérilité.

20 En pratique, si le nettoyage complet de la hotte nécessite un temps long, incompatible avec les contraintes liées au nombre d'échantillons à traiter chaque jour sur un poste, ce nettoyage sera effectué de manière imparfaite. L'encombrement de l'espace de travail par des objets nécessaires aux manipulations est donc gênant à double titre : d'une part, il nuit à l'efficacité de la hotte en perturbant les flux laminaires, et d'autre part, il rend la  
25 stérilisation de la hotte longue et difficile, et en pratique souvent imparfaite.

Dans ce contexte, il existe donc un besoin important d'un poste de sécurité microbiologique adapté aux besoins de la FIV, c'est-à-dire assurant la protection simultanée de l'échantillon, du manipulateur et de l'environnement, et permettant l'observation microscopique des gamètes et des embryons, tout en réduisant le risque de contaminations croisées. Les contraintes liées à la nature des manipulations dans la FIV se retrouvent dans les manipulations d'autres échantillons biologiques, notamment les manipulations impliquant des cellules humaines ou animales pour la recherche, la thérapie cellulaire, la thérapie génique, ou la recherche sur les embryons. Un poste de sécurité adapté à la FIV est donc approprié aux autres manipulations précitées. Idéalement, un tel PSM sera facile et rapide à nettoyer et ne nécessitera pas l'introduction sous la hotte de matériel autre que du matériel consommable ou le cas échéant stérilisable par autoclave.

Le PSM de l'invention permet de répondre à au moins une partie de ces contraintes. En effet, un point essentiel et original du PSM de l'invention est l'intégration, dans le corps du PSM, de tout le matériel nécessaire à la fécondation *in vitro*, et notamment du système optique, afin de dépouiller au maximum l'espace de travail pour obtenir un bon niveau de protection de l'échantillon et du manipulateur, mais aussi pour que l'intérieur de la hotte soit rapidement et entièrement nettoyable entre chaque échantillon, réduisant ainsi le risque de contamination entre les prélèvements.

Le PSM de l'invention peut être un PSM de type I, II, ou même III. Les PSM de type III sont des enceintes en atmosphère confinée maintenue en sous-pression, dans lesquelles les manipulations sont effectuées par le moyen de gants scellés à l'enceinte. L'intégration de matériel optique au corps d'un tel PSM fait partie de la présente invention. De manière générale, l'intégration de matériel optique au corps de n'importe quel poste de sécurité microbiologique, de manière à obtenir un espace de travail le plus dégagé

possible, fait partie de l'invention. De manière préférée, le PSM est de type II, par exemple une hotte à flux laminaire vertical.

Dans une réalisation préférée du PSM de l'invention, illustrée à la figure 1, l'espace de travail est défini par le plancher 1 de la hotte, des parois latérales verticales 2, le fond 3 de la hotte, son plafond 4, et une vitre protectrice antérieure 5. Il comprend en outre une platine 6 propre à recevoir l'échantillon dans une zone d'observation de l'espace de travail, ladite platine comportant une première fenêtre transparente 7 permettant l'éclairage et/ou l'observation dudit échantillon.

Dans cette réalisation de l'invention, le dispositif optique d'observation comprend des moyens d'éclairage 8 propres à éclairer l'échantillon dans la zone d'observation, et des moyens de collection de lumière 9 permettant l'observation d'un échantillon placé dans cette zone.

Le dispositif optique est de préférence un système vidéo, permettant de stocker des images, par exemple une caméra autofocus 9 reliée à un dispositif d'enregistrement des images, tel qu'un ordinateur 17 équipé de moyens de stockage des données 18. Les caméras peuvent être de type numérique ou analogique. De manière préférée, le système vidéo comprend essentiellement un bloc optique 9 pour la collection des photons issus de la zone d'observation et un système de pilotage des différents réglages, pour la focale, l'éclairage 8 et le grossissement. Ce bloc optique peut être inversé pour permettre une fixation sous le plan de travail 1 (plancher de la hotte). La majorité des gestes techniques se font à des grossissements relativement faibles (de 10 à 70 environ). Cependant, un système optique plus performant permettant des grossissements jusqu'à 400 ou plus, peut être utilisé pour observer les zygotes à J+1 et les embryons, à J+2 ou J+3, voire jusqu'à J+6. A cet effet, une caméra tri CDD ½ pouce peut être utilisée pour observer sur

un écran 11 de 17" (pouces) un objet de 125  $\mu\text{m}$  sous une taille d'environ 100 mm.

Alternativement, d'autres types de dispositifs de collection d'image peuvent être utilisés. A titre d'exemple, mais de manière non restrictive, on peut citer  
5 les barrettes de dispositif à couplage de charge (plus connues sous l'acronyme anglais CCD).

L'élément optique 9 peut être placé sous le plancher 1 de la hotte, en regard d'une fenêtre transparente 7 de préférence intégrée dans la platine 6, comme cela est représenté sur les figures 1 et 2. Egalement de préférence,  
10 la platine 6, située autour de cette fenêtre 7, est une zone chauffante.

D'autres dispositions du système optique sont envisageables. Par exemple, une partie au moins des moyens d'éclairage et/ou de collection de lumière peut être située derrière une ou plusieurs fenêtres solidaires de l'une au moins des parois et distinctes de la fenêtre 7. En particulier, certains  
15 éléments, notamment les moyens de collection de lumière, peuvent être placés au niveau du plafond 4 de la hotte, en regard de la zone d'observation.

Dans un exemple particulier de réalisation de l'invention, l'ensemble de la zone d'observation est éclairé par un dispositif 8 dit de « longue frontale »,  
20 par adjonction d'un condenseur placé à environ 182 mm de l'échantillon. Ce système comporte une fibre optique fixée à l'extrémité d'un tube inox, lui-même solidaire de la paroi du poste de travail. Le générateur de lumière a par exemple une puissance de 150 W, et il est de préférence réglable. Bien entendu, tout autre moyen d'éclairage connu de l'homme du métier peut être  
25 utilisé pour éclairer la zone de manipulation et d'observation de l'échantillon.

Dans une réalisation particulière de l'invention, le pilotage de l'ensemble de l'appareil est exécuté depuis un pédalier situé au sol sous le poste de travail, afin de diriger les différents réglages par pression sur les p<sup>o</sup>dales affectées à

chacune des fonctions. Le système de motorisation comprend par exemple trois paires de pédales placées sur un support incliné :

- 2 pédales pour la mise au point
- 2 pédales pour le zoom
- 2 pédales pour l'éclairage.

Bien entendu, des systèmes de commande autre que les pédales sont envisageables. Par exemple, le réglage fin de la mise au point peut être effectué par des touches actionnables par les doigts au niveau d'un tableau de bord 10, placé sur l'avant de la hotte, à gauche de la zone d'observation de l'échantillon, comme cela est indiqué dans la figure 1. Les réglages du zoom et de l'éclairage peuvent aussi être effectués à partir de ce tableau de bord.

Le cas échéant, un boîtier de commande, placé en dehors de la hotte, comprend un dispositif de réglage de la vitesse des motorisations, par exemple un potentiomètre (ce réglage devra être fait préférentiellement avant que l'opérateur n'introduise ses mains dans le flux).

De manière préférée, le PSM de l'invention comporte un écran d'observation 11 solidaire de l'une des parois définissant l'espace de travail, ledit écran permettant de visualiser les images collectées par le dispositif de collection de lumière 9. De manière encore préférée, l'écran d'observation 11 est un écran plat solidaire d'une des parois verticales 2 ou 3 de la hotte, par exemple de la paroi postérieure 3 de l'espace de travail, derrière la zone d'observation de l'échantillon.

Par ailleurs, il existe d'autres impératifs généraux afin d'assurer une qualité optimum de la technique de FIV. En premier lieu, la température des manipulations doit être maintenue autour de 37°C, ce qui implique un plan de travail thermostaté à environ 37°C. Dans cette optique, le plancher 1 de

l'espace de travail peut comporter une ou plusieurs zones équipées de moyens de régulation de température, de manière à être thermostatées à une température comprise entre 20 et 45 °C, en particulier à 37°C +/- 0,2°C. En particulier, la platine 6 peut être équipée de tels moyens de régulation de sa température. Il peut s'agir, par exemple, de résistances chauffantes placées sous la platine 6, et par conséquent à l'extérieur de l'espace de travail. Le cas échéant, la totalité du plancher de l'espace de travail peut être thermostatée.

Une autre contrainte importante dans le cas de la FIV est de maintenir le pH des milieux de culture aux alentours de 7 – 7,2, pour ne pas altérer la viabilité des gamètes et des embryons. Ces cellules ne tolérant pas bien des tampons de type Hepes, le pH est maintenu par la présence de bicarbonate dans les milieux de culture et un système de gazage à 5% de CO<sub>2</sub> pour équilibrer ces milieux. Entre deux manipulations sur un échantillon, cet échantillon est donc de préférence placé dans une enceinte 13 maintenue à environ 5% de CO<sub>2</sub>. Cette enceinte 13 peut par exemple être constituée d'une cloche reliée à une arrivée de gaz 12 par un tube 14. Afin de réduire le risque de contaminations inter-échantillons mentionné plus haut, cette cloche peut être remplacée après traitement des échantillons de chaque patient. Dans ce but, on peut envisager soit des cloches autoclavables (par exemple, en verre), qui doivent être systématiquement stérilisées après usage, soit des cloches à usage unique, par exemple des consommables en plastique fin. Le tube 14 est préférentiellement à usage unique, mais il peut aussi être réutilisable après stérilisation par autoclave ou par tout autre moyen connu de l'homme du métier.

Un aspect de l'invention concerne une collerette de protection 15, destinée à protéger l'arrivée de gaz 12 des projections possibles de liquide biologique ou d'aérosols. En effet, une arrivée de gaz constitue inévitablement une rupture du plan de la paroi dans laquelle elle est intégrée, et peut donc être délicate à nettoyer.

Des outils et des protocoles permettant de réduire le nombre d'objets nécessaires dans la hotte lors du traitement de chaque échantillon sont également proposés, toujours dans le but de limiter le risque de contamination nosocomiale entre échantillons et/ou patientes. Ainsi, un système de saisie des données observées, destiné à remplacer l'actuelle « feuille de paillasse », peut être intégré au PSM. L'enregistrement des données doit pouvoir se faire sans passer par l'intermédiaire d'un clavier classique, qui ne répond pas aux règles de sécurité sanitaire. Plusieurs types de moyens de saisie des données peuvent être envisagés. Une première possibilité est d'intégrer dans le plan de travail de la hotte un clavier tactile 16, composé de touches prédéfinies. Une deuxième possibilité consiste à utiliser un écran où apparaissent des touches prédéfinies, sur lesquelles on peut diriger un pointeur. L'écran est de préférence solidaire d'une des parois du PSM. Il peut s'agir par exemple de l'écran d'observation (11) ou d'une fenêtre active de celui-ci. Alternativement, il peut s'agir d'un écran distinct de (11). Les mouvements du pointeur et l'activation des touches peuvent être effectués à partir d'une aire de contrôle du pointeur, plus connue sous la terminologie anglaise « *track pad* », ou, plus généralement, par tout moyen connu sous le nom de « souris ». Tout autre moyen connu de l'homme du métier peut aussi être utilisé pour la saisie des données concernant les échantillons traités.

Ces moyens de saisie des données (écran tactile, *track pad* ou autre) sont, par exemple, situés à gauche du système optique (contrairement à ce qui est représenté à la figure 1). Une possibilité de « désactivation » des moyens de saisie doit être prévue pour éviter l'entrée de données aberrantes lors du nettoyage du plan de travail de la hotte. Une liste possible des touches prédéfinies d'un clavier 16 est donnée ci-après :

Touches des jours :	J1	J2	J3	J4	J5	J6
Chiffres						
Touche de visualisation de la feuille de paillasse						



Touche de validation

Touches prédéfinies :

	Ovocyte
	Pellucide vide
5	Ovocyte atrétique
	VG
	M1
	M2
	0GP
10	1GP
	2GP
	0PN
	1PN
	2PN
15	3PN
	Sup 3PN
	Granuleux
	Vacuole
	(Type) A
20	(Type) B
	(Type) C
	(Type) D
	Morula
	Morula compactée
25	Début de cavitation
	Blastocyste
	Blastocyste expansé.

Un exemple d'agencement des touches d'un tel clavier est illustré sur la figure 3.

Le système de saisie des données peut être relié à un poste informatique du laboratoire, à partir duquel sont rentrées l'identité des patients, associés aux échantillons à traiter, et les caractéristiques de la tentative. Le dossier du couple auquel appartient l'échantillon à traiter, peut être appelé et visualisé au niveau de l'écran de la hotte, par exemple par l'intermédiaire du numéro de la tentative. Ce numéro peut comprendre 6 chiffres (ex : 990123). Le clavier peut donc contenir aussi des touches numériques.

Deux cas sont à envisager :

1. la caméra ne permet pas d'observer les zygotes et les embryons
2. la caméra permet d'observer les zygotes et les embryons.

Dans le premier cas, l'enregistrement des données se fait sur une seule journée.

Lorsque le manipulateur appuie sur une touche prédéfinie du clavier 16, la donnée correspondante s'inscrit sur la feuille de paillasse. Une touche de visualisation de la feuille de paillasse permet de la faire apparaître à l'écran 11 en cas de besoin, le cas échéant dans un espace prédéfini de l'écran.

Dans le second cas, où la caméra permet d'observer les zygotes et les embryons, des touches de jour sont nécessaires.

L'enregistrement des données se fait en effet sur plusieurs jours (de 3 à 8 jours).

Il faut donc pouvoir rappeler la feuille de paillasse du couple correspondant pour continuer à entrer les données. Par exemple, le numéro de la tentative permet de faire apparaître la feuille de paillasse, la touche correspondant au jour (ex : J1 ou J2) permet l'entrée des données dans la bonne colonne. Des données numériques peut être entrées dans des cases de la feuille de paillasse, comme par exemple la quotation pour la survie des

spermatozoïdes à 24 heures. Un exemple de clavier de saisie possible est représenté à la Figure 3.

Les parois 1, 2, 3, 4 et 5, définissant l'espace de travail, sont de préférence planes et constituées de matériaux lisses, lavables et résistant aux produits d'entretien, tels que les produits contenant des ammoniums quaternaires ou les virucides les plus puissants. Alternativement et/ou de manière complémentaire, le plancher est constitué d'un ou plusieurs éléments démontables et jetables ou stérilisables par autoclave ou par tout autre moyen.

## REVENDICATIONS

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM), comportant des parois (1- 5) définissant un espace de travail, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif optique placé en-dehors de l'espace de travail, et permettant l'observation d'un échantillon dans au moins une zone de l'espace de travail par une fenêtre transparente solidaire de l'une desdites parois.
2. PSM selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une platine (6) propre à recevoir l'échantillon dans ladite zone d'observation de l'espace de travail, ladite platine comportant une première fenêtre transparente (7) permettant l'éclairage et/ou l'observation dudit échantillon.
3. PSM selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce le plancher (1) de l'espace de travail comporte une ou plusieurs zones équipées de moyens de régulation de température, de manière à être thermostatées à une température comprise entre 20 et 45 °C, en particulier à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .
4. PSM selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce que la platine (6) est équipée de moyens de régulation de température, permettant de fixer la température au niveau de sa surface entre 20 et 45 °C, en particulier à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .
5. PSM selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le dispositif optique d'observation comprend des moyens d'éclairage (8) propres à éclairer l'échantillon dans la zone d'observation, et des moyens de collection de lumière (9) permettant l'observation d'un échantillon placé dans cette zone.

6. PSM selon la revendication 5, caractérisé en ce que le dispositif de collection de lumière (9) comporte une caméra autofocus.
- 5 7. PSM selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que le dispositif de collection de lumière est placé sous la première fenêtre (7) de la platine (6).
8. PSM selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que tout ou partie des moyens d'éclairage et/ou de collection de lumière sont situés derrière une ou plusieurs fenêtres distinctes de la première fenêtre (7) et solidaires de l'une au moins des parois, en particulier de la paroi supérieure (4).  
10
9. PSM selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que le dispositif de collection de lumière (9) est agencé pour assurer plusieurs grossissements de l'image entre 10 et 1000, en particulier entre 10 et 400.
- 15 10. PSM selon la revendication 9, caractérisé en ce que le dispositif de collection de lumière (9) comporte en outre un système de mise au point fine à chaque grossissement.
11. PSM selon la revendication 10, caractérisé en ce que le système de mise au point fine est piloté à partir d'un tableau de bord (10) situé en-dehors de l'espace de travail et/ou solidaire de l'une des parois définissant l'espace de travail.  
20
12. PSM selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce que le dispositif de collection de lumière (9) est relié à un dispositif d'enregistrement des images collectées.

13. PSM selon la revendication 12, caractérisé en ce que le dispositif d'enregistrement des images est un ordinateur équipé de moyens de stockage de données.
- 5 14. PSM selon l'une quelconque des revendications 5 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte un écran d'observation (11) solidaire de l'une des parois définissant l'espace de travail, ledit écran permettant de visualiser les images collectées par le dispositif de collection de lumière (9).
- 10 15. PSM selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'écran d'observation (11) est un écran plat intégré à la paroi postérieure (3) de l'espace de travail.
- 15 16. PSM selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une zone de gazage des échantillons, comportant une arrivée de gaz (12), une enceinte permettant le confinement du gaz (13), et un dispositif de connexion (14) reliant ladite arrivée de gaz (12) à ladite enceinte (13).
17. PSM selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'enceinte (13) et le dispositif de connexion (14) reliant l'arrivée de gaz (12) à ladite enceinte (13) sont facilement démontables.
- 20 18. PSM selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'enceinte (13) et le dispositif de connexion (14) reliant l'arrivée de gaz (12) à ladite enceinte (13) sont des pièces rapportées.
19. PSM selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'il l'arrivée de gaz (12) est intégrée à l'une des parois verticales (2) et (3)

définissant l'espace de travail, et en ce que l'enceinte (13) est une cloche transparente, reliée à l'arrivée de gaz (12) par un tuyau.

5 20. PSM selon l'une des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que le dispositif de connexion (14) reliant l'arrivée de gaz à l'enceinte comporte une collerette protectrice (15) destinée à protéger l'arrivée de gaz (12) des projections.

21. PSM selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens de saisie de données.

10 22. PSM selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdits moyens de saisie de données comprennent un clavier tactile (16) solidaire du plancher (1) définissant l'espace de travail.

15 23. PSM selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdits moyens de saisie de données comprennent un écran et une aire de contrôle d'un pointeur, ladite aire de contrôle étant solidaire du plancher (1), et ledit pointeur étant propre à permettre l'activation de touches prédéfinies matérialisées sur l'écran.

24. PSM selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que les moyens de saisie de données sont reliés à un ordinateur.

20 25. PSM selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, caractérisé en ce que les parois (1-5), définissant l'espace de travail sont planes et constituées de matériaux lisses, lavables et résistant aux produits d'entretien.

26. PSM selon l'une quelconque des revendications 1 à 25, caractérisé en ce que le plancher (1) est constitué d'un ou plusieurs éléments démontables et jetables ou stérilisables par autoclave.